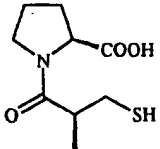


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12P 7/42	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22153 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07852</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Oktober 1999 (15.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 98119455.8 15. Oktober 1998 (15.10.98) EP 99110170.0 26. Mai 1999 (26.05.99) EP</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; Münchensteinerstrasse 38, CH-4052 Basel (CH).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LOCHER, Tamara [CH/CH]; Feldegg B, CH-3940 Steg (CH). URBAN, Eva, Maria [DE/CH]; Napolconstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). MOLINARI, Francesco [IT/IT]; Università degli Studi di Milano, Microbiologia Industriale, Via Celoria, 2, I-20133 Milano (IT). ARAGOZZINI, Fabrizio [IT/IT]; Università degli Studi di Milano, Microbiologia Industriale, Via Celoria, 2, I-20133 Milano (IT). RODUIT, Jean-Paul [CH/CH]; Loos, CH-3979 Grône (CH).</p> <p>(74) Anwälte: RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl et al., Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING 3-HYDROXYCARBOXYLIC ACIDS AND CAPTOPRIL		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON 3-HYDROXYCARBONSÄUREN UND VON CAPTOPRIL		
<div style="text-align: center;"> (I)</div>		
<p>(57) Abstract</p> <p>Captopril (1-[(2S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-proline) of formula (I) is prepared from 2-methyl-1,3-propandiol by microbial oxidation to obtain (R)-3-hydroxy-2-methyl propionic acid, by chlorination to obtain (R)-3-chloro-2-methyl propionyl chloride and by subsequent reaction with L-proline to obtain the corresponding N-(3-chloro-2-methylpropionyl-L-proline) and by conversion of the chloromethyl group into the mercaptomethyl group. Captopril is a antihypertensive pharmaceutical active substance.</p>		
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Captopril (1-[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin) der Formel (I) wird aus 2-Methyl-1,3-propandiol durch mikrobielle Oxidation zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure, Chlorierung zu (R)-3-Chlor-2-methylpropionylchlorid, und anschliessender Umsetzung mit L-Prolin zum entsprechenden N-(3-Chlor-2-methylpropionyl-L-Prolin) und Überführung der Chlormethylgruppe in die Mercaptoethylgruppe hergestellt. Captopril ist ein blutdrucksenkender pharmazeutischer Wirkstoff.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

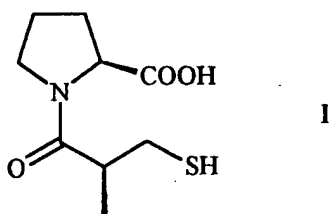
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxycarbonsäuren und von Captopril

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Captopril der Formel



- 10 Captopril (1-[(2*S*)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin), ist ein wichtiger pharmazeutischer Wirkstoff zur Blutdrucksenkung.

- Da Captopril zwei Asymmetriezentren und als Strukturelement die natürliche Aminosäure L-Prolin enthält, sind im wesentlichen zwei Synthesestrategien möglich. Bei der Verknüpfung von
- 15 L-Prolin mit einem racemischen 2-Methylpropionsäurederivat entsteht ein Diastereomeregemisch, das auf herkömmliche Weise getrennt werden kann. Ein offensichtlicher Nachteil dieser Methode liegt darin, dass etwa die Hälfte des Produkts, nämlich das unerwünschte Diastereomere, als Abfall entsorgt werden muss. Es wurden daher Verfahren entwickelt, denen die andere Strategie, nämlich die Verknüpfung von L-Prolin mit einem
- 20 Derivat der (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure, zugrundeliegt und die somit nur das „richtige“ Diastereomere liefern (Shimazaki et al., Chem. Pharm. Bull. 30 (9), 1982, 3139-3164). Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure dienen beispielsweise Isobuttersäure oder Methacrylsäure (DE-A-30 41 224). Bekannt ist auch ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methyl-
- 25 propionsäure, durch Umsetzung des entsprechenden Diols mit *Gluconobacter roseus* IAM 1841 (Ohta et al., J.Org.Chem. (1982), 47, 2400-2404). Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass die Ausbeute an (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure nur bei maximal 47 % bezogen auf

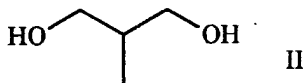
das eingesetzte Diol liegt, was das Verfahren für einen grosstechnischen Einsatz uninteressant macht.

Weiter weist das Verfahren den Nachteil auf, dass die (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure
5 nur mit einer Enantiomerenreinheit von maximal 83 % ee erhalten wird.

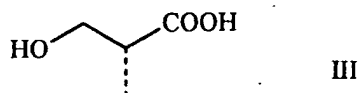
Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Captopril bereitzustellen, welches von einer gut zugänglichen Verbindung ausgeht und das Zwischenprodukt (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure in guter chemischer und optischer
10 Ausbeute liefert.

Diese Aufgabe wurde durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

In einer ersten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird somit 2-Methyl-1,3-propandiol
15 der Formel



mit Mikroorganismen der Gattungen Acetobacter oder Gluconobacter oder mittels zellfreien
20 Enzymen aus diesen Mikroorganismen zu (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel



oxidiert.
25

Die erfindungsgemäss eingesetzten Mikroorganismen der Gattungen Acetobacter und Gluconobacter sind also befähigt, 2-Methyl-1,3-propandiol zu (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure zu oxidieren.

Bevorzugte für das Verfahren eingesetzte Mikroorganismen der Gattung *Acetobacter* sind solche der Spezies *Acetobacter pasteurianus*, insbesondere des Stammes *Acetobacter pasteurianus* mit der Bezeichnung DSM 8937. Ebenso bevorzugt sind Mikroorganismen der Spezies *Acetobacter* sp., insbesondere des Stammes *Acetobacter* sp. mit der Bezeichnung

5 DSM 12417. Bevorzugte für das Verfahren eingesetzte Mikroorganismen der Gattung *Gluconobacter* sind solche der Spezies *Gluconobacter oxydans/suboxydans*, insbesondere des Stammes *Gluconobacter oxydans/suboxydans* mit der Bezeichnung DSM 12416. Der Stamm *Acetobacter pasteurianus* DSM 8937 wurde bereits in der CH-A-686 003 beschrieben. *Acetobacter* sp. DSM 12417 und *Gluconobacter oxydans/suboxydans* DSM 12416 wurden als

10 *Acetobacter* spp. CA bzw. *Gluconobacter oxydans* NCIMB 621 ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Molinari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:989-994). Besonders bevorzugt wird das Verfahren mit Mikroorganismen der *Acetobacter*-Stämme DSM 12417 und DSM 8937 durchgeführt. Ebenfalls geeignet sind die funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten der genannten Mikroorganismen.

15

Die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 12417 und DSM 12416 wurden am 11.09.98, die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 8937 am 31.01.1994 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascherodeweg 1b, D-38124 Braunschweig, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

20

Unter "funktionell äquivalente Varianten und Mutanten" werden Mikroorganismen verstanden, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften und Funktionen wie die Ursprungsmikroorganismen besitzen. Derartige Varianten und Mutanten können zufällig z. B. durch UV-Strahlung gebildet werden.

25

Die Enzyme für das zellfreie System können durch fachmännisch übliches Aufschliessen der Mikroorganismen gewonnen werden. Hierzu kann beispielsweise die Ultraschall-, French-Press- oder Lysozym-Methode verwendet werden. Diese zellfreien Enzyme können auch auf einem geeigneten Trägermaterial immobilisiert werden. Vorzugsweise werden zellfreie Enzyme

30 der obengenannten Mikroorganismen der Gattung *Acetobacter*, insbesondere der Spezies *Acetobacter* mit der Bezeichnung DSM 12417 und mit der Bezeichnung DSM 8937, eingesetzt.

- Als geeignete Kohlenstoffquelle können die Mikroorganismen beispielsweise Zucker, Carbonsäuren oder Zuckeralkohole verwenden. Als Zucker können Hexosen wie beispielsweise Glucose oder Fructose oder Pentosen, wie beispielsweise Ribose oder Xylose, angewendet werden. Bevorzugt wird Glucose eingesetzt. Als Carbonsäuren können Mono-, Di- oder Tricarbonsäuren bzw. deren Salze verwendet werden wie beispielsweise DL-Lactat, Acetat, Succinat oder Citronensäure. Bevorzugt wird Citrat eingesetzt.
- Als Zuckeralkohole können dreiwertige oder sechswertige Alkohole Verwendung finden, wie beispielsweise Glycerin oder D-Mannitol. Bevorzugt wird Glycerin eingesetzt.
- 10 Als Anzuchtmedium können die fachmännisch üblichen dienen, wie beispielsweise das Vollmedium gemäss Handbook of Microbiological Media, 1993, CRC Press, R. M. Atlas and L. C. Parks, S. 48 und 541 oder die in Tabelle 1 beschriebenen Medien. Vorzugsweise werden die Medien gemäss Tabelle 1 angewendet.
- 15 Während der Anzucht werden zweckmässig die wirksamen Enzyme der Mikroorganismen induziert. Als Enzym-Induktor können Di- oder Triole wie beispielsweise Glycerin, Mannitol oder 2-Methyl-1,3-propandiol eingesetzt werden. Vorzugsweise wird Glycerin eingesetzt.
- 20 Zweckmässig erfolgt die Anzucht bei einer Temperatur von 15 bis 50 °C, vorzugsweise von 25 bis 40 °C, besonders bevorzugt von 27 bis 30°C, und bei einem pH-Wert von pH 4 und 10, vorzugsweise zwischen 4,5 und 7.
- Die Umsetzung kann nach üblicher Anzucht mit ruhenden Zellen (nicht wachsenden Zellen, die keine Kohlenstoff- und Energiequelle mehr benötigen) oder mit wachsenden Zellen von Acetobacter und Gluconobacter durchgeführt werden. Alternativ kann die Umsetzung ohne übliche Anzucht direkt durch Zugabe der Mikroorganismen zu 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel II durchgeführt werden. Bevorzugt wird die Umsetzung nach üblicher Anzucht und mit wachsenden Zellen durchgeführt. Zweckmässig werden die wirksamen Enzyme mit den zuvor
- 25 beschriebenen Enzyminduktoren induziert.
- 30

Zweckmässig wird die Umsetzung von 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel II unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

- Als Medium für das Verfahren können die fachmännisch üblichen dienen, wie beispielsweise das zuvor beschriebene Vollmedium oder Puffer, wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer, HEPES-Puffer, Citratpuffer, Succinat-Puffer oder die in Tabelle 1 beschriebenen Medien. Vorzugsweise wird das Verfahren in den Medien gemäss Tabelle 1 durchgeführt.
- 10 Das Verfahren kann in einem Ein- oder Zweiphasensystem durchgeführt werden. Bevorzugt wird es in einem Einphasensystem durchgeführt. Als Zweiphasensystem kann ein flüssig / flüssig Phasensystem eingesetzt werden, das aus einer wässrigen Phase und einer mit der wässrigen Phase nicht oder nur wenig mischbaren organischen Phase besteht. Das flüssig / flüssig Phasensystem sollte hierbei so gewählt werden, dass (R)-3-Hydroxy-2-
- 15 methylpropionsäure der Formel III maximal und 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel II minimal in der organischen Phase akkumulieren. Maximale Akkumulation der (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III und minimale Akkumulation des 2-Methyl-1,3-propandiols der Formel II kann bei einem hohen Verteilungskoeffizienten (K_p) der (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III und einem niedrigen Verteilungskoeffizienten
- 20 (K_p) des 2-Methyl-1,3-propandiols der Formel II zwischen der organischen und der wässrigen Phase erreicht werden.

- Als wässrige Phase wird zweckmässig das obengenannte Medium eingesetzt. Als organische Phase wird zweckmässig ein organisches Lösungsmittel insbesondere ein organisches
- 25 Lösungsmittel zusammen mit einem extraktiven Agens eingesetzt. Als organische Lösungsmittel können beispielsweise C_{6-12} -Alkane, gesättigte oder ungesättigte C_{8-22} -Alkanole, gesättigte oder ungesättigte C_{2-12} -Alkanone oder C_{2-12} -Alkansäureester eingesetzt werden. Als C_{6-12} -Alkane können beispielsweise Isooctan, Dodecan oder Hexan eingesetzt werden. Bevorzugt wird Isooctan oder Dodecan eingesetzt. Als gesättigte oder ungesättigte C_{8-22} -
- 30 Alkanole können beispielsweise Octanol oder Oleylalkohol eingesetzt werden. Bevorzugt wird Oleylalkohol eingesetzt. Als gesättigte oder ungesättigte C_{2-12} -Alkanone können beispielsweise 2-Pentanon oder Methylisobutylketon eingesetzt werden. Bevorzugt wird 2-Pentanon

eingesetzt. Als C₂₋₁₂-Alkansäureester können beispielsweise Ethylacetat oder Butylacetat eingesetzt werden.

- Als extraktives Agens können beispielsweise Alkylphosphinoxide, Alkylphosphate, aliphatische Amine oder quaternäre Ammoniumsalze eingesetzt werden. Als Alkylphosphinoxid kann beispielsweise Trioctylphosphinoxid (TOPO) eingesetzt werden. Als aliphatisches Amin kann beispielsweise Trioctylamin (TOA) eingesetzt werden. Als quaternäres Ammoniumsalz kann beispielsweise Aliquat 336 (Hersteller: Henkel AG) eingesetzt werden. Bevorzugt werden als extraktives Agens Alkylphosphinoxide oder quaternäre Ammoniumsalze eingesetzt.
- 10 Besonders bevorzugt sind Trioctylphosphinoxid oder Aliquat 336.

- Die Umsetzung kann unter einmaliger, mehrmaliger oder kontinuierlicher Zugabe von 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel II durchgeführt werden. Die Zugabe von 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel II wird solchermassen durchgeführt, dass die Konzentration 20 Gew.%,
15 bevorzugt 5 Gew.%, besonders bevorzugt 1 Gew.%, nicht übersteigt.

Der pH Wert des Mediums liegt zweckmässig in einem Bereich von 4 bis 10, vorzugsweise von 4,5 bis 7.

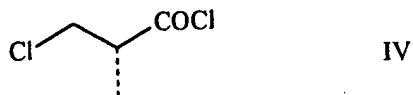
- 20 Zweckmässig wird die Umsetzung bei einer Temperatur von 15 bis 50 °C, vorzugsweise von 25 bis 40 °C, besonders bevorzugt von 27 bis 30°C, durchgeführt.

- Nach einer üblichen Umsetzungszeit von 20 bis 70 Stunden kann (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III in sehr hoher bis quantitativer Ausbeute erhalten werden.
- 25 Hierbei werden Umsetzungsraten von 0,1 – 1 g/l ODh bevorzugt von 0,1 – 0,5 g/l Odh erreicht.

- Wird das Verfahren in einem Einphasensystem im oben genannten Medium durchgeführt, kann (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III durch übliche Aufarbeitungsmethoden wie z. B. durch Abtrennung der Biomasse, Ansäuern, Destillation, Chromatographie, Elektro-
30 dialyse oder Extraktion, insbesondere durch kontinuierliche Extraktion isoliert werden.

Wird das Verfahren in einem Zweiphasensystem durchgeführt, kann (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III direkt aus der organischen Phase isoliert werden.

- In einer zweiten Stufe wird die (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel III mit einem
- 5 Chlorierungsmittel zu dem entsprechenden Säurechlorid der Formel



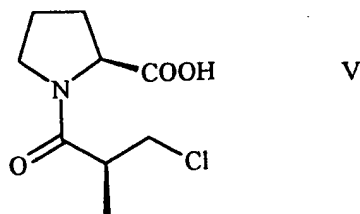
umgesetzt.

- 10 Als Chlorierungsmittel können beispielsweise Thionylchlorid, Sulfurylchlorid, Phosphortrichlorid oder Phosphoroxychlorid eingesetzt werden. Bevorzugt wird Thionylchlorid eingesetzt.

- Zweckmässig wird die Reaktion in Gegenwart einer organischen Base als Katalysator
- 15 durchgeführt. Als organische Base kann beispielsweise Dimethylformamid, Triethylamin, Pyridin, N,N-Dimethylanilin oder Imidazol eingesetzt werden. Bevorzugt wird N,N-Dimethylformamid eingesetzt. Die Reaktion kann in einem organischen Lösungsmittel wie beispielsweise Methylenchlorid durchgeführt werden.

- 20 Die Umsetzung in der zweiten Stufe erfolgt zweckmässig bei einer Temperatur von 50 bis 100 °C, vorteilhaft von 60 bis 90 °C.

In einer dritten Stufe wird das Säurechlorid der Formel IV mit L-Prolin zur Verbindung der Formel



umgesetzt .

5 Zweckmässig wird die Umsetzung in Gegenwart einer Base durchgeführt. Als Basen eignen sich beispielsweise Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Natriumcarbonat oder organische Basen. Bevorzugt wird Natriumhydroxid eingesetzt. Zweckmässig wird die Reaktion in einem Lösungsmittel wie beispielsweise Wasser durchgeführt.

10 Die Umsetzung in der dritten Stufe erfolgt zweckmässig bei einer Temperatur von 5 bis 80 °C, vorteilhaft von 10 bis 40 °C.

In der vierten Stufe wird die Verbindung der allgemeinen Formel V mit einem Sulfid zu Captopril der Formel I umgesetzt.

15 Als Sulfid können beispielsweise Natrium- oder Ammoniumhydrogensulfid oder Natriumtrithiocarbonat eingesetzt werden. Bevorzugt wird Natriumhydrogensulfid eingesetzt.

20 Zweckmässig wird ein Lösungsmittel eingesetzt. Als Lösungsmittel können polare Lösungsmittel wie Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid oder auch Wasser eingesetzt werden. Bevorzugt wird Wasser eingesetzt.

Zweckmässig wird nach der Umsetzung mit Sulfid ein Reduktionsmittel hinzugegeben, um das als Nebenprodukt entstehende Disulfid des Captoprils zu reduzieren. Als Reduktionsmittel kann beispielsweise Zinkpulver eingesetzt werden.

25

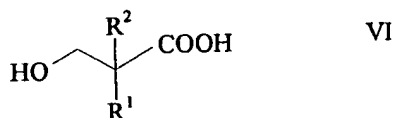
Die Umsetzung in der vierten Stufe erfolgt zweckmässig bei einer Temperatur von 10 bis 90 °C, vorteilhaft von 50 bis 80 °C.

30 Nach einer üblichen Umsetzungszeit ab der zweiten bis zur vierten Stufe von insgesamt 10 - 20 Stunden erhält man Captopril der Formel I, welches nach üblichen Methoden aufgearbeitet werden kann.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxycarbonsäuren, beispielsweise (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure, die wertvolle Ausgangsmaterialien zur Herstellung weiterer Verbindungen wie pharmazeutischen Wirkstoffen sind, bereitzustellen, welches die 3-Hydroxycarbonsäuren in guten chemischen und, im Falle optischer Isomere, auch in guten optischen Ausbeuten liefert.

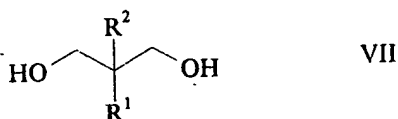
Diese Aufgabe wurde durch das Verfahren nach Anspruch 9 gelöst.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist also ein neues Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel



- 15 worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, Amino, C_1 - C_6 -Alkyl, Aryl, Arylalkyl oder Cycloalkyl bedeuten.

Die Herstellung der 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI erfolgt derart, dass man Diole der allgemeinen Formel



20

worin R^1 und R^2 die oben genannte Bedeutung haben, mit Mikroorganismen der Gattungen Acetobacter oder Gluconobacter oder mittels zellfreien Enzymen aus diesen Mikroorganismen umsetzt.

25

Unter C_{1-6} -Alkyl wird zweckmässig eine gegebenenfalls substituierte geradkettige oder verzweigte C_{1-6} -Alkylgruppe verstanden. Namentlich erwähnt seien Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Pentyl und seine Isomeren sowie Hexyl und seine

Isomeren. Unter Aryl wird zweckmässig gegebenenfalls substituiertes Phenyl verstanden. Unter Arylalkyl wird zweckmässig gegebenenfalls substituierter Phenylalkyl verstanden. Unter Phenylalkyl wird zweckmässig Phenyl C₁₋₆-Alkyl, bevorzugt Benzyl verstanden. Unter Cycloalkyl wird zweckmässig gegebenenfalls substituiertes C₃₋₆-Cycloalkyl, bevorzugt Cyclohexyl, verstanden. Zweckmässige Substituenten der Alkylgruppen, der Aromaten der Arylfunktion, oder der Cycloalkylgruppen sind z. B. Halogen, Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Alkoxy oder Hydroxy. Unter Halogen ist hier und im folgenden Fluor, Chlor, Brom oder Jod zu verstehen. Bevorzugt hat R¹ die Bedeutung von Wasserstoff. R² hat bevorzugt die Bedeutung von C₁₋₆-Alkyl, besonders bevorzugt die Bedeutung von Methyl.

10

Bevorzugt werden optisch aktive 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI hergestellt, worin R¹ ≠ R² ist. Besonders bevorzugt wird das optisch aktive (R)-Enantiomer der 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI hergestellt.

15 Die Ausgangsverbindungen der allgemeinen Formel VII sind gängige organische Syntheschemikalien.

Als Mikroorganismen für das erfindungsgemäße Verfahren können insbesondere die Mikroorganismen der Gattungen Acetobacter und Gluconobacter eingesetzt werden, die
20 befähigt sind, 2-Methyl-1,3-propandiol zu (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure zu oxidieren.

Bevorzugte für das Verfahren eingesetzte Mikroorganismen der Gattung Acetobacter sind solche der Spezies Acetobacter pasteurianus, insbesondere des Stammes Acetobacter pasteurianus mit der Bezeichnung DSM 8937. Ebenso bevorzugt sind Mikroorganismen der
25 Spezies Acetobacter sp., insbesondere des Stammes Acetobacter sp. mit der Bezeichnung DSM 12417. Bevorzugte für das Verfahren eingesetzte Mikroorganismen der Gattung Gluconobacter sind solche der Spezies Gluconobacter oxydans/suboxydans, insbesondere des Stammes Gluconobacter oxydans/suboxydans mit der Bezeichnung DSM 12416. Der Stamm Acetobacter pasteurianus DSM 8937 wurde bereits in der CH-A-686 003 beschrieben.
30 Acetobacter sp. DSM 12417 und Gluconobacter oxydans/suboxydans DSM 12416 wurden als Acetobacter spp. CA bzw. Gluconobacter oxydans NCIMB 621 ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Molinari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:989-994). Besonders

bevorzugt wird das Verfahren mit Mikroorganismen der Acetobacter-Stämme DSM 12417 und DSM 8937 durchgeführt. Ebenfalls geeignet sind die funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten der genannten Mikroorganismen.

- 5 Die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 12417 und DSM 12416 wurden am 11.09.98, die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 8937 am 31.01.1994 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascherodeweg 1b, D-38124 Braunschweig, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.
- 10 Unter "funktionell äquivalente Varianten und Mutanten" werden Mikroorganismen verstanden, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften und Funktionen wie die Ursprungsmikroorganismen besitzen. Derartige Varianten und Mutanten können zufällig z. B. durch UV-Strahlung gebildet werden.
- 15 Die Enzyme für das zellfreie System können durch fachmännisch übliches Aufschliessen der Mikroorganismen gewonnen werden. Hierzu kann beispielsweise die Ultraschall-, French-Press- oder Lysozym-Methode verwendet werden. Diese zellfreien Enzyme können auch auf einem geeigneten Trägermaterial immobilisiert werden. Vorzugsweise werden zellfreie Enzyme der obengenannten Mikroorganismen der Gattung Acetobacter, insbesondere der Spezies
20 Acetobacter mit der Bezeichnung DSM 12417 und mit der Bezeichnung DSM 8937, eingesetzt.

- Als geeignete Kohlenstoffquelle können die Mikroorganismen beispielsweise Zucker, Carbonsäuren oder Zuckeralkohole verwenden. Als Zucker können Hexosen wie bei-
- 25 spielsweise Glucose oder Fructose oder Pentosen, wie beispielsweise Ribose oder Xylose, angewendet werden. Bevorzugt wird Glucose eingesetzt. Als Carbonsäuren können Mono-, Di- oder Tricarbonsäuren bzw. deren Salze verwendet werden wie beispielsweise DL-Lactat, Acetat, Succinat oder Citronensäure. Bevorzugt wird Citrat eingesetzt.
 - Als Zuckeralkohole können dreiwertige oder sechswertige Alkohole Verwendung finden, wie
30 beispielsweise Glycerin oder D-Mannitol. Bevorzugt wird Glycerin eingesetzt.

Als Anzuchtmedium können die fachmännisch üblichen dienen, wie beispielsweise das Vollmedium gemäss Handbook of Microbiological Media, 1993, CRC Press, R. M. Atlas and L. C. Parks, S. 48 und 541 oder die in Tabelle 1 beschriebenen Medien. Vorzugsweise werden die Medien gemäss Tabelle 1 angewendet.

5

Während der Anzucht werden zweckmässig die wirksamen Enzyme der Mikroorganismen induziert. Als Enzym-Induktor können Di- oder Triole wie beispielsweise Glycerin, Mannitol oder 2-Methyl-1,3-propandiol eingesetzt werden. Vorzugsweise wird Glycerin eingesetzt.

- 10 Zweckmässig erfolgt die Anzucht bei einer Temperatur von 15 bis 50 °C, vorzugsweise von 25 bis 40 °C, besonders bevorzugt von 27 bis 30°C, und bei einem pH-Wert von pH 4 und 10, vorzugsweise zwischen 4,5 und 7.

- Die Umsetzung kann nach üblicher Anzucht mit ruhenden Zellen (nicht wachsenden Zellen, die
15 keine Kohlenstoff- und Energiequelle mehr benötigen) oder mit wachsenden Zellen von Acetobacter und Gluconobacter durchgeführt werden. Alternativ kann die Umsetzung ohne übliche Anzucht direkt durch Zugabe der Mikroorganismen zu 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel VII durchgeführt werden. Bevorzugt wird die Umsetzung nach üblicher Anzucht und mit wachsenden Zellen durchgeführt. Zweckmässig werden die wirksamen Enzyme mit den
20 zuvor beschriebenen Enzyminduktoren induziert.

Zweckmässig wird die Umsetzung von Diolen der allgemeinen Formel VII unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

- 25 Als Medium für das Verfahren können die fachmännisch üblichen dienen, wie beispielsweise das zuvor beschriebene Vollmedium oder Puffer, wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer, HEPES-Puffer, Citratpuffer, Succinat-Puffer oder die in Tabelle 1 beschriebenen Medien. Vorzugsweise wird das Verfahren in den Medien gemäss Tabelle 1 durchgeführt.

30

Das Verfahren kann in einem Ein- oder Zweiphasensystem durchgeführt werden. Bevorzugt wird es in einem Einphasensystem durchgeführt. Als Zweiphasensystem kann ein flüssig /

flüssig Phasensystem eingesetzt werden, das aus einer wässrigen Phase und einer mit der wässrigen Phase nicht oder nur wenig mischbaren organischen Phase besteht. Das flüssig / flüssig Phasensystem sollte hierbei so gewählt werden, dass 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI maximal und die Diole der allgemeinen Formel VII minimal in der organischen Phase akkumulieren. Maximale Akkumulation der 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI und minimale Akkumulation der Diole der allgemeinen Formel VII kann bei einem hohen Verteilungskoeffizienten (K_p) der 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI und einem niedrigen Verteilungskoeffizienten (K_p) der Diole der allgemeinen Formel VII zwischen der organischen und der wässrigen Phase erreicht werden.

10

Als wässrige Phase wird zweckmässig das obengenannte Medium eingesetzt. Als organische Phase wird zweckmässig ein organisches Lösungsmittel insbesondere ein organisches Lösungsmittel zusammen mit einem extraktiven Agens eingesetzt. Als organische Lösungsmittel können beispielsweise C_{6-12} -Alkane, gesättigte oder ungesättigte C_{8-22} -Alkanole, gesättigte oder ungesättigte C_{2-12} -Alkanone oder C_{2-12} -Alkansäureester eingesetzt werden. Als C_{6-12} -Alkane können beispielsweise Isooctan, Dodecan oder Hexan eingesetzt werden. Bevorzugt wird Isooctan oder Dodecan eingesetzt. Als gesättigte oder ungesättigte C_{8-22} -Alkanole können beispielsweise Octanol oder Oleylalkohol eingesetzt werden. Bevorzugt wird Oleylalkohol eingesetzt. Als gesättigte oder ungesättigte C_{2-12} -Alkanone können beispielsweise 2-Pentanon oder Methylisobutylketon eingesetzt werden. Bevorzugt wird 2-Pentanon eingesetzt. Als C_{2-12} -Alkansäureester können beispielsweise Ethylacetat oder Butylacetat eingesetzt werden.

20

Als extraktives Agens können beispielsweise Alkylphosphinoxide, Alkylphosphate, aliphatische Amine oder quarternäre Ammoniumsalze eingesetzt werden. Als Alkylphosphinoxid kann beispielsweise Trioctylphosphinoxid (TOPO) eingesetzt werden. Als aliphatisches Amin kann beispielsweise Trioctylamin (TOA) eingesetzt werden. Als quarternäres Ammoniumsalz kann beispielsweise Aliquat 336 (Hersteller: Henkel AG) eingesetzt werden. Bevorzugt werden als extraktives Agens Alkylphosphinoxide oder quarternäre Ammoniumsalze eingesetzt. Besonders bevorzugt sind Trioctylphosphinoxid oder Aliquat 336.

30

Die Umsetzung kann unter einmaliger, mehrmaliger oder kontinuierlicher Zugabe von Diolen der allgemeinen Formel VII durchgeführt werden. Die Zugabe von Diolen der allgemeinen Formel VII wird solchermassen durchgeführt, dass die Konzentration 20 Gew.%, bevorzugt 5 Gew.%, besonders bevorzugt 1 Gew.%, nicht übersteigt.

5

Der pH Wert des Mediums liegt zweckmässig in einem Bereich von 4 bis 10, vorzugsweise von 4,5 bis 7.

10 Zweckmässig wird die Umsetzung bei einer Temperatur von 15 bis 50 °C, vorzugsweise von 25 bis 40 °C, besonders bevorzugt von 27 bis 30°C, durchgeführt.

Nach einer üblichen Umsetzungszeit von 20 bis 70 Stunden können 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI in sehr hoher bis quantitativer Ausbeute erhalten werden. Hierbei werden Umsetzungsraten von 0,1 – 1 g/l ODh bevorzugt von 0,1 – 0,5 g/l Odh erreicht.

15

Wird das Verfahren in einem Einphasensystem im oben genannten Medium durchgeführt, können die 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI durch übliche Aufarbeitungsmethoden wie z. B. durch Abtrennung der Biomasse, Ansäuern, Destillation, Chromatographie, Elektrodialyse oder Extraktion, insbesondere durch kontinuierliche Extraktion isoliert werden.

20

Wird das Verfahren in einem Zweiphasensystem durchgeführt, können die 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI direkt aus der organischen Phase isoliert werden.

Beispiele

Tabelle 1

Medium 1

Mannitol	25 g l ⁻¹
Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
Pepton	3 g l ⁻¹

Medium 2

Glycerin	10 g l ⁻¹
Hefeextrakt	2 g l ⁻¹
Sojapepton	1 g l ⁻¹
SL4	1 ml
Vitaminlösung	1 ml

Medium 3

Glycerin	10 g l ⁻¹
Sojapepton	6 g l ⁻¹
Hefeextrakt	12 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.2 g l ⁻¹
NH ₄ Cl	0.1 g l ⁻¹
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.0004 g l ⁻¹
MgSO ₄	0.02 g l ⁻¹
D-Panhotensäure	0.01 g l ⁻¹
Nikotinsäure	0.002 g l ⁻¹
Biotin	0.002 g l ⁻¹

Medium 4

Mannitol	25 g ^l ⁻¹
Hefeextrakt	10 g ^l ⁻¹

Medium 5

Mannitol	20 g ^l ⁻¹
Sojapepton	6 g ^l ⁻¹
Hefeextrakt	12 g ^l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.2 g ^l ⁻¹
NH ₄ Cl	0.1 g ^l ⁻¹
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.0004 g ^l ⁻¹
MgSO ₄	0.02 g ^l ⁻¹
D-Panhotensäure	0.01 g ^l ⁻¹
Nikotinsäure	0.002 g ^l ⁻¹
Biotin	0.002 g ^l ⁻¹

Medium 6

Mannitol	10 g ^l ⁻¹
Hefeextrakt	2 g ^l ⁻¹
Sojapepton	1 g ^l ⁻¹
SL4	1 ml
Vitaminlösung	1 ml

Spurenelementlösung (SL4)

ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg l ⁻¹
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	90 mg l ⁻¹
H ₃ BO ₃	300 mg l ⁻¹
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg l ⁻¹
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg l ⁻¹
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg l ⁻¹
EDTANa ₂ x 2 H ₂ O	5 g l ⁻¹
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g l ⁻¹

Vitaminlösung

Pyridoxalhydrochlorid	10 mg l ⁻¹
Riboflavin	5 mg l ⁻¹
Nicotinamid	5 mg l ⁻¹
Thiaminhydrochlorid	5 mg l ⁻¹
Biotin	2 mg l ⁻¹
Panhotensäure	5 mg l ⁻¹
p-Aminobenzoensäure	5 mg l ⁻¹
Folsäure	2 mg l ⁻¹
Cyanocobalamin	5 mg l ⁻¹

5 Beispiel 1**Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Schüttelkolben**

Der Stamm *Acetobacter* sp. (DSM 12417) wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane in 100 ml Medium 2 bei 30 °C und 140 Umdrehungen / min angezogen. Der pH-Wert sank

- 10 während der Wachstumsphase auf pH 5,0 bis 4,5. Innerhalb von ca. 50 Stunden werden 5 g 2-

Methyl-1,3-propandiol im Schüttelkolben vollständig zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure mit einem ee-Wert von 95 % umgesetzt. Es konnte keine weitere Oxidation zur Di-Säure nachgewiesen werden.

5

Beispiel 2

Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Fermenter

10 In einem 2l-Fermenter wurde der Stamm *Acetobacter* sp. (DSM 12417) in Medium 3 angezogen.

Der Fermenter wurde bei 121 °C 20 min lang sterilisiert. Das Fermentationsmedium (Medium 3) wurde mit 100 ml *Acetobacter* sp. (DSM 12417) aus einer Schüttelkultur beimpft.

15 Bei 28 °C wurde der Stamm bis zu einer OD_{650nm} von ca. 8 angezogen. Die Zugabe von 2-Methyl-1,3-propandiol (sterilfiltriert) erfolgte bei einer OD_{650nm} von 2. Der pH-Wert wurde mit 10 %iger NaOH/KOH (4:1) auf pH-Wert 5,0 eingestellt und geregelt.

70 Stunden nach Zugabe des 2-Methyl-1,3-propandiol und Verbrauch des gesamten Glycerins wurde die gesamte Kultur durch Zentrifugation geerntet. 2-Methyl-1,3-propandiol war vollständig zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt worden.

20 Der die (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure enthaltende Kulturüberstand wurde mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung mit NaSO₄ wurde bei 30-40°C und 20 mbar am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Essigesterethylphase wurde bei 120 °C im Ölbad bei 0,3 mm Hg abdestilliert. Das so gewonnene Produkt (Destillat) wies folgende Daten auf: ee-Wert 93,6 %, 99 % Gehalt.

25 ¹H-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz): δ = 3,70 (dd, 1H);
3,53 (dd, 1H);
2,49 (m, 1H);
1,07 (d, 3H).

Beispiel 3**Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure**

5 Acetobacter sp. (DSM 12417) wurde in Medium 2 angezogen. Eine gut gewachsene Kultur in der exponentiellen Phase wurde bei 4 °C durch 20 minütige Zentrifugation geerntet, in Citrat-Puffer (200 mM, pH=5,0) einmal gewaschen und zu einer Konzentration von 100g^l⁻¹ Feuchtgewicht in Puffer aufgenommen. Innerhalb von 22 Stunden wurden 10 g^l⁻¹ 2-Methyl-1,3-propandiol vollständig umgesetzt. Der ee-Wert der (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure war 93,5 %.

10

Beispiel 4**Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Fermenter**

15 In einem 15 L-Fermenter wurde der Stamm Acetobacter sp. (DSM 12417) in Medium 2 angezogen.

Der Fermenter wurde bei 121 °C 20 min lang sterilisiert. Das Fermentationsmedium (Medium 3) wurde mit 100 ml Acetobacter sp. (DSM 12417) aus einer Schüttelkultur beimpft. Bei 28 °C wurde der Stamm bis zu einer OD_{650nm} von ca. 10 angezogen. Die Zugabe von 2-Methyl-1,3-propandiol (sterilfiltriert) erfolgte bei einer OD_{650nm} von 2. Der pH-Wert wurde mit 8M NaOH/KOH (4:1) auf pH-Wert 5,0 eingestellt und geregelt.

20 Ca. 100 Stunden nach Zugabe des 2-Methyl-1,3-propandiol und Verbrauch des gesamten Glycerins wurde die gesamte Kultur durch Zentrifugation geerntet. 2-Methyl-1,3-propandiol war vollständig zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt worden. Die analytische Ausbeute an (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure hat 75 g/l betragen. Die Umsatzungsrate betrug 0.1-0.3 g/l OD h. Der die (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure enthaltende Kulturüberstand wurde mit Aktivkohle behandelt und anschliessend mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung mit NaSO₄ wurde bei 30-40°C und 20 mbar am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Essigesterethylphase wurde bei 120 °C im Ölbad bei 0,3 mm Hg abdestilliert. Das so gewonnene Produkt (Destillat) wies folgende Daten auf: ee-Wert 94.0%, 99 % Gehalt.

30

Beispiel 5**Isolierung der (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure mittels kontinuierlicher Extraktion**

- 212.6 g aufkonzentrierte Lösung (mit 48.3 g (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure wird mit
5 Essigsäureethylester 16 Stunden lang bei 50 °C kontinuierlich in einem 0.5L Normag Extraktor
für leichte Lösungsmittel extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt und am
Rotationsverdampfer eingeeengt. Man erhält das Rohöl. Nach GC Flächenprozent: 94.5 % ee,
NMR (400MHz, DMSO) rein.

10 Beispiel 6**Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure**

- Acetobacter sp. (DSM 8937) wurde in Medium 2 angezogen bei 28 °C, 140 rpm.
Eine gut gewachsene Kultur in der exponentiellen Phase wurde bei 4 °C durch 20 minütige
15 Zentrifugation geerntet, in Citrat-Puffer (200 mM, pH=5.5) einmal gewaschen und zu einer
Konzentration von OD_{650nm} 5 in Puffer aufgenommen. Innerhalb von 10 Stunden wurden 10 g l⁻¹
2-Methyl-1,3-propandiol vollständig umgesetzt. Der ee-Wert der (R)-3-Hydroxy-2-
methylpropionsäure war 96.7 %.

20 Beispiel 7**Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure**

- In einem 15 L-Fermenter wurde der Stamm Gluconobacter suboxydans (DSM 12416) in
Medium 5 angezogen.
25 Der Fermenter wurde bei 121 °C 20 min lang sterilisiert. Das Fermentationsmedium
(Medium 5) wurde mit 200 ml Gluconobacter suboxydans. (DSM 12416) aus einer
Schüttelkultur beimpft. Bei 28 °C wurde der Stamm bis zu einer OD_{650nm} von ca. 10
angezogen. Die Zugabe von 2-Methyl-1,3-propandiol (sterilfiltriert) erfolgte bei einer
OD_{650nm} von 2. Der pH-Wert wurde mit 8M NaOH/KOH (4:1) auf pH-Wert 5,0
30 eingestellt und geregelt.
Ca. 70 Stunden nach Zugabe des 2-Methyl-1,3-propandiol und Verbrauch des gesamten
Glycerins wurde die gesamte Kultur durch Zentrifugation geerntet. 2-Methyl-1,3-

propandiol war zur R-(2-Hydroxy-3-methyl)-propionsäure mit ee-Wert von 95 % umgesetzt worden. Die analytische Ausbeute an R-(2-Hydroxy-3-methyl)-propionsäure hat 17 g/l betragen. Die Produktionsrate betrug somit 0.1-0.3 g/l OD h.

5 **Beispiel 8**

Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure

Der Stamm *Gluconobacter suboxydans* (DSM 12416) wurde im 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane in 100 ml Medium 6 bei 30 °C und 140 Umdrehungen / min angezogen. Der pH-Wert
10 sank während der Wachstumsphase auf pH 5,0 bis 4,5. Innerhalb von ca. 50 Stunden werden 5 g 2-Methyl-1,3-propandiol im Schüttelkolben zu 4.6 g R-(2-Hydroxy-3-methyl)propionsäure mit einem ee-Wert von 95 % umgesetzt.

Beispiel 9

15 **Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Zweiphasensystem**

Der Stamm *Acetobacter* sp. (DSM 12417) wurde von der Festplatte in einen Schüttelkolben mit Medium 4 überimpft und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 25 ml dieser Vorkultur überimpft in 200 ml des gleichen Mediums. Nach 24 Stunden wurden die
20 Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Puffer (Citrat-Puffer, 100mM, pH = 5.0) gewaschen und für die Biotransformation eingesetzt.

Die Biotransformation wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt mit 10 ml ruhenden Zellen in Citrat-Puffer (100 mM, pH = 5.0), bei 28 °C und 200 rpm. Die organische Phase (Isooctan) wurde bis zur Bildung zweier Phasen zugegeben. Zusätzlich wurden 20 %
25 Trioctylphosphinoxid zugegeben. Innerhalb von 6 Stunden wurden 5 g/L 2-Methyl-1,3-propandiol vollständig zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt (ee 94 %).

Beispiel 10

Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Zweiphasensystem

30

Acetobacter sp. (DSM 12417) wurde von der Festplatte in einen Schüttelkolben mit Medium 4 überimpft und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 25 ml dieser

Vorkultur überimpft in 200 ml des gleichen Mediums. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Puffer (Citrat-Puffer, 100mM, pH = 5.0) gewaschen und für die Biotransformation eingesetzt.

- Die Biotransformation wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt mit 20 ml ruhenden Zellen in Citrat-Puffer (100 mM, pH = 5.0), bei 28 °C und 200 rpm. Die organische Phase (Isooctan) wurde bis zur Bildung zweier Phasen zugegeben [~5mL]. Zusätzlich wurden 20 % Trioctylphosphinoxid zugegeben. Innerhalb von 5 Stunden wurden 9 g/L 2-Methyl-1,3-propandiol zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt (ee 94 %).

10

Beispiel 11

Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Zweiphasensystem

- Acetobacter sp. (DSM 12417) wurde von der Festplatte in einen Schüttelkolben mit Medium 4 überimpft und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 25 ml dieser Vorkultur überimpft in 200 ml des gleichen Mediums. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Puffer (Citrat-Puffer, 100mM, pH = 5.0) gewaschen und für die Biotransformation eingesetzt.

- Die Biotransformation wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt mit 20 ml ruhenden Zellen in Citrat-Puffer (100 mM, pH = 5.0), bei 28 °C und 200 rpm. Die organische Phase (Oleylalkohol) wurde bis zur Bildung zweier Phasen zugegeben [~5mL]. Zusätzlich wurden 40% Trioctylphosphinoxid zugegeben. Innerhalb von 5 Stunden wurden 10 g/L 2-Methyl-1,3-propandiol zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt (ee 94 %).

25

Beispiel 12

Herstellung von (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure im Zweiphasensystem

- Acetobacter sp. (DSM 12417) wurde von der Festplatte in einen Schüttelkolben mit Medium 4 überimpft und bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 48 Stunden wurden 25 ml dieser Vorkultur überimpft in 200 ml des gleichen Mediums. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Puffer (Citrat-Puffer, 100mM, pH = 5.0) gewaschen und für die Biotransformation eingesetzt.

Die Biotransformation wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt mit 20 ml ruhenden Zellen in Citrat-Puffer (100 mM, pH = 5.0), bei 28 °C und 200 rpm. Die organische Phase (Oleylalkohol) wurde bis zur Bildung zweier Phasen zugegeben [~5mL]. Zusätzlich wurden 10% Aliquat 336 zugegeben. Innerhalb von 4 Stunden wurden 8 g/L 2-Methyl-1,3-propandiol vollständig zur (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure umgesetzt (ee 94 %).

Beispiel 13

Herstellung von (R)-3-Chlor-2-methylpropionylchlorid

20 ml Thionylchlorid und 0.1 ml Dimethylformamid wurden in einem 3-Hals Kolben unter N₂ vorgelegt. 10 g (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure aus Beispiel 4 (ee-Wert 94%) wurden zudosiert bei 0°C. Als die Gasentwicklung beendet war, wurde das Gemisch vorsichtig auf 60 °C geheizt (ab 40 °C wieder Gasentwicklung). Wenn keine Gasentwicklung mehr sichtbar war, wurde das überschüssige Thionylchlorid i.V. abdestilliert (200 mbar), anschliessend wurde der ölige Rückstand bei 16 mbar destilliert (Siedepunkt 38 °C). Es wurden 10.17 g (R)-3-Chlor-2-methylpropionylchlorid als farblose Flüssigkeit (75 % Ausbeute) erhalten

¹H-NMR (CDCl₃) : 1.42 (d, 3H);
 3.27 (m, 1H);
 3.73 (m, 2H).

Beispiel 14

Herstellung von N-3-Chlor-2-methylpropionyl-L-Prolin

4.1 g L-Prolin wurden in 30 ml Wasser bei 5 °C vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden parallel während ½ h 19.2 g 15 % NaOH und 5 g (R)-3-Chlor-2-methylpropionylchlorid zugetropft, wobei die Temperatur < 10 °C blieb. Das Gemisch wurde noch 1 h bei 20 °C gerührt, dann mit 8 ml 6 N HCl auf pH 1 gestellt (Produkt fällt zum Teil aus). Die weisse Suspension wurde extrahiert mit 2 x 35 ml Essigester, die vereinigten Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt. Der feste Rückstand wurde kristallisiert aus 30 ml Hexan / Essigester (1 : 1). Es

wurden 5.34 g N-3-Chlor-2-methylpropionyl-L-Prolin als weisser Feststoff erhalten (68 % Ausbeute, Gehalt 99.9 %, ee 97 %).

¹H-NMR (CDCl₃) :

5 1.24 (d, 3H);
 2.09 (m, 3H);
 1.33 (m, 1H);
 3.00 (m, 1H);
 3.48 (m, 1 H);
 3.64 (m, 2H);
10 3.81 (t, 1H);
 4.65 (m, 1H);
 11.30 (bs, 1H).

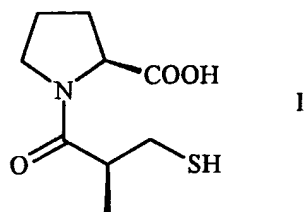
15 **Beispiel 15**

Herstellung von Captopril

Eine Lösung von N-3-Chlor-2-methylpropanoyl-L-Prolin (0,5 g) und Natriumhydrogensulfid (0,84 g) in Wasser (12 ml) wurde für 4 h unter N₂ bei 80 °C gerührt. Die Reaktionslösung
20 wurde anschliessend mit 10 ml kaltem Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure auf pH 1 gestellt und es wurde 0,5 g Zinkpulver zugegeben. Das Ganze wurde 4 h unter N₂ gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden von der Reaktionslösung abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das kombinierte Filtrat und Waschwasser wurden mit Essigester (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung gewaschen und über
25 wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, was ein farbloses Syrup ergab. Die Ausbeute lag bei 80 %.

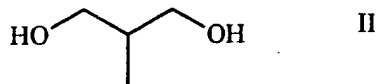
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Captopril der Formel



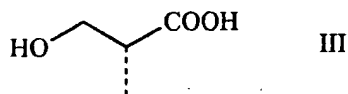
5

dadurch gekennzeichnet, dass in einer ersten Stufe 2-Methyl-1,3-propandiol der Formel



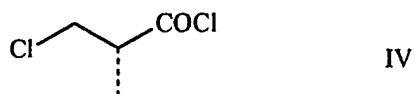
10

mit Mikroorganismen der Gattungen Acetobacter oder Gluconobacter oder mittels zellfreien Enzymen aus diesen Mikroorganismen zu (R)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel



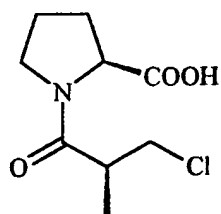
15

oxidiert wird, welche in einer zweiten Stufe mit einem Chlorierungsmittel zu dem entsprechenden Säurechlorid der Formel



20

umgesetzt wird, welches in einer dritten Stufe mit L-Prolin zur Verbindung der Formel



V

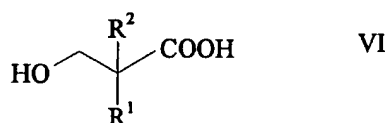
umgesetzt wird, welches weiter in einer vierten Stufe mit einem Sulfid zu Captopril der
5 Formel I überführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in der ersten Stufe mit Mikroorganismen der Spezies *Acetobacter pasteurianus* oder *Acetobacter* sp., insbesondere den Stämmen mit der Bezeichnung DSM 12417 und mit der Bezeichnung
10 DSM 8937, oder mit Mikroorganismen der Spezies *Gluconobacter oxydans*/suboxydans, insbesondere dem Stamm mit der Bezeichnung DSM 12416, oder deren funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten durchgeführt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die
15 Umsetzung mit wachsenden oder ruhenden Mikroorganismen der Gattung *Acetobacter* oder mit wachsenden Mikroorganismen der Gattung *Gluconobacter* durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in der ersten Stufe mit wachsenden Zellen durchgeführt wird.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Umsetzung in der ersten Stufe die wirksamen Enzyme induziert werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das in der
25 zweiten Stufe eingesetzte Chlorierungsmittel Thionylchlorid ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in der dritten Stufe in Gegenwart einer organischen Base als Katalysator durchgeführt wird.

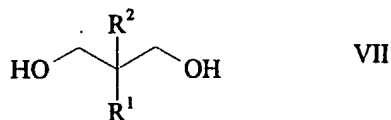
5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet dass das in der vierten Stufe eingesetzte Sulfid Natriumhydrogensulfid ist.

9. Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel



10

worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, Amino, C_{1-6} -Alkyl, Aryl, Arylalkyl oder Cycloalkyl bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man Diole der allgemeinen Formel



15

worin R^1 und R^2 die oben genannte Bedeutung haben, mit Mikroorganismen der Gattung Acetobacter oder Mikroorganismen der Gattung Gluconobacter oder mittels zellfreien Enzymen aus diesen Mikroorganismen umgesetzt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass optisch aktive 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI hergestellt werden, worin $\text{R}^1 \neq \text{R}^2$ ist.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass das optisch aktive (R)-Enantiomer der 3-Hydroxycarbonsäuren der allgemeinen Formel VI hergestellt wird.

25

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung mit wachsenden oder ruhenden Mikroorganismen der Gattung Acetobacter oder mit wachsenden Mikroorganismen der Gattung Gluconobacter durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung mit Mikroorganismen der Spezies *Acetobacter pasteurianus* oder *Acetobacter* sp., insbesondere den Stämmen mit der Bezeichnung DSM 12417 und DSM 8937 oder deren funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten durchgeführt wird.
- 5
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die wirksamen Enzyme induziert werden.
- 10
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einem pH von 4 bis 10 und einer Temperatur von 15 bis 50 °C durchgeführt wird.

Inter: **Final Application No**
PCT/EP 99/07852

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHTA ET AL.: "Enantiotopically Selective Oxidation of Alpha, Omega-Diols with the Enzyme Systems of Microorganisms." J. ORG. CHEM., vol. 47, 1982, pages 2400-2404, XP002129875 cited in the application page 2400	9-15
Y	—	1-8
Y	SHIMAZAKI, M ET AL.: "Synthesis of captopril starting from an optically active beta-hydroxy acid." CHEM. PHARM. BULL., vol. 30, no. 9, 1982, pages 3139-3146, XP000876504 abstract	1-8
	— — / —	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

8 February 2000

23/02/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer _____

Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/EP 99/07852

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 178 (C-034), 10 December 1980 (1980-12-10) & JP 55 118438 A (SAGAMI CHEM RES CENTER), 11 September 1980 (1980-09-11) abstract	9-15
A	US 4 618 583 A (ROBISON ROBERT S ET AL) 21 October 1986 (1986-10-21) abstract	9-15
A	US 4 981 794 A (ROBISON ROBERT S ET AL) 1 January 1991 (1991-01-01) abstract	9-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07852

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 55118438 A	11-09-1980	NONE	
US 4618583 A	21-10-1986	NONE	
US 4981794 A	01-01-1991	CA 1239361 A EP 0151419 A JP 60180595 A	19-07-1988 14-08-1985 14-09-1985

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

inter. Anmeld. Aktenzeichen

PCT/EP 99/07852

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P7/42

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OHTA ET AL.: "Enantiotopically Selective Oxidation of Alpha, Omega-Diols with the Enzyme Systems of Microorganisms." J. ORG. CHEM., Bd. 47, 1982, Seiten 2400-2404, XP002129875 in der Anmeldung erwähnt	9-15
Y	Seite 2400	1-8
Y	SHIMAZAKI, M ET AL.: "Synthesis of captopril starting from an optically active beta-hydroxy acid." CHEM. PHARM. BULL., Bd. 30, Nr. 9, 1982, Seiten 3139-3146, XP000876504 Zusammenfassung	1-8
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

23/02/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentean 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Beauftragter

Mata Vicente, T.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzungen
PCT/EP 99/07852

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 004, no. 178 (C-034), 10. Dezember 1980 (1980-12-10) & JP 55 118438 A (SAGAMI CHEM RES CENTER), 11. September 1980 (1980-09-11) Zusammenfassung	9-15
A	US 4 618 583 A (ROBISON ROBERT S ET AL) 21. Oktober 1986 (1986-10-21) Zusammenfassung	9-15
A	US 4 981 794 A (ROBISON ROBERT S ET AL) 1. Januar 1991 (1991-01-01) Zusammenfassung	9-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07852

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 55118438 A	11-09-1980	KEINE	
US 4618583 A	21-10-1986	KEINE	
US 4981794 A	01-01-1991	CA 1239361 A	19-07-1988
		EP 0151419 A	14-08-1985
		JP 60180595 A	14-09-1985